

Ville Yrjölä, lääketieteen kandidaatti

Lääketieteellinen tiedekunta, virologian osasto

Helsingin yliopisto

# Tyrosiinikinaasi Hck:n spesifinen inhibitio – kohti täsmällisempää HIV:n hoitoa

26.08.2018, Tutkielma

Tutkielman ohjaaja: Kalle Saksela

Helsingin yliopisto, Lääketieteellinen tiedekunta

ville.yrjola@helsinki.fi

# HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Lääketieteellinen tiedekunta		Virologian osasto	
Tekijä – Författare – Author			
Ville Yrjölä			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Tyrosiinikinaasi Hck:n spesifinen inhibitio – kohti täsmällisempää HIV:n hoitoa			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level		Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages
		26.08.2018	28
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>HIV-epidemia on maailmanlaajuinen terveysongelma ja se koskettaa WHO:n arvion mukaan suoraan lähes neljäkymmenen miljoonan ihmisen elämää. Hankinnallisen immuunikadon aiheuttajana HI-virus on tunnettu 80-luvun alkupuolelta lähtien, mutta infektion tehokas hoito on osoittautunut haastavaksi tehtäväksi. Nykyaikainen antiretroviraalinen lääkitys laskee parhaimmillaan virustasot potilaan veressä mittaamattoman matalaksi ja estää sairauden etenemisen AIDS-vaiheeseen sekä tarttumisen eteenpäin. Tästä huolimatta sairauteen tiedetään liittyvän myös muita terveysongelmia, kuten tiettyjen syöpäsairauksien ilmaantumista. Merkittävänä mekanismina infektion aiheuttaman sairastavuuden taustalla, lääkityksestä huolimatta, ajatellaan olevan krooninen immuuniaktivaatio, johon nykyaikainen lääkitys ei näytä tarjoavan riittävää apua. Matalista virustasoista huolimatta potilaiden elimistöstä voidaan todeta lisääntyneeseen ja poikkeavaan immuunijärjestelmän toimintaan viittaavia merkkejä.</p> <p>Tämän tutkimuksen tarkoitus oli karakterisoida Src-perheeseen kuuluvan tyrosiinikinaasi Hck:n inhibiittorimolekyylien RM-1-87 ja RM-1-183 toimintaa elävässä solumallissa. Hck:n liiallinen aktiivisuus näyttelee roolia mm. HIV-infektioon liittyvässä immuuniaktivaatiossa sekä lukuisissa syöpäsairauksissa. Tutkimuksen kokeellinen osuus jakautui kahteen vaiheeseen: tehokkaan inhibiittorikonsentraation selvittäminen ja inhibiittorien spesifisyyden mittaaminen verrattuna muihin Src-perheen tyrosiinikinaaseihin.</p> <p>Tutkimuksessa käytettiin solumallina HEK 293T -linjan soluja, joihin transfektoitiin kalsiumfosfaattimenetelmää hyödyntäen tutkittava tyrosiinikinaasi, tämän substraatti paxilliini sekä Nef, joka toimi transfektiokontrollina. Transfektion jälkeen soluja inkuboitiin inhibiittoria sisältävässä elatusliuoksessa.</p> <p>Tutkituilla inhibiittorimolekyyleillä ei näyttänyt olevan toivottua spesifisyyttä Hck:ta kohtaan muihin Src-perheen kinaaseihin verrattuna, joskin jatkoselvityksessä Nef:n läsnäolo näytti vaikuttavan inhibiittorin tehokkuuteen. (201)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
HIV, AIDS, Src-kinase, Hck, Nef			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

# Sisällys

1 Johdanto.....	1
2 Kirjallisuuskatsaus .....	2
2.1 HI-virus .....	2
2.2 HIV-infektion eteneminen.....	3
2.3 HIV-infektion kroonistuminen ja viruksen reservoaarit.....	4
2.4 HIV-infektio ja krooninen immuuniaktivaatio.....	5
2.5 HIV:n apuproteiinit ja Nef .....	9
2.6 Proteiinien toiminnallinen säätely .....	10
2.7 Src-tyrosiinikinaasit .....	10
2.8 Hck:n rakenne ja säätely .....	11
2.9 Hck ja HIV .....	12
2.10 Hck-inhibiittorit ja merkitys muissa sairauksissa .....	13
3 Tutkimuksen tarkoitus.....	14
4 Aineisto.....	15
5 Menetelmät.....	15
5.1 Solujen viljely.....	15
5.2 Transfektioon käytettävien plasmidien eristys .....	16
5.3 Transfektiot .....	16
5.4 Plasmidit.....	16
5.5 Solujen hajotus ja proteiinien eristys.....	17
5.6 Western blot.....	17
5.7 Fosforylaatiosignaalien detektio .....	18
6 Tulokset .....	18
6.1 Tehokkaan inhibiittorikonsentraation määrittäminen.....	18
6.2 Inhibiittorin spesifisyyden määrittäminen tyrosiinikinaasi Hck:lle .....	20
6.3 Nef vaikutus inhibiittorin toimintaan .....	21
7 Pohdinta .....	22
Lähdeluettelo .....	24

# 1 Johdanto

HIV on merkittävin ihmisellä esiintyvä hankinnallista immuunikatoa aiheuttava infektiosairaus. WHO:n tilaston mukaan vuonna 2016 maailmassa oli HIV-positiivisia potilaita 36,7 miljoonaa ja samana vuonna arvioitiin ilmaantuvaksi 1,6 miljoonaa tuoretta infektiota. Globaalin HIV-epidemian arvioidaan johtaneen yli 35 miljoonan ihmisen kuolemaan. Maailmanlaajuisesti noin puolet HIV-potilaista on elinikäisen antiretroviraalisen lääkityksen piirissä (1).

Tehokas antiretroviraalinen lääkitys on parantanut HI-virukseen sairastuneiden potilaiden ennustetta ja mahdollistanut heille lähes normaalia vastaavan elämän. Nykyisin käytettävät lääkeaineet ovat kuitenkin melko uusia ja kokemuksia niiden pitkäaikaisesta käytöstä on vielä melko niukasti. Tehokkaalla antiviraalisella lääkityksellä potilaiden virustasot saadaan laskettua alle mittausrajan. Tästä huolimatta HIV-potilailla voidaan todeta merkkejä kroonisesta immuuniaktivaatiosta, joka altistaa heidät mm. erilaisille maligniteeteille (2).

Infektioon liittyvä krooninen immuuniaktivaatio on monitekijäinen tapahtuma, jonka kehitystä ja merkitystä ei vielä tarkkaan ymmärretä (3). Immuuniaktivaatiolla ajatellaan kuitenkin olevan merkittävä vaikutus immuunipuutoksen kehittymisen sekä useiden HIV-infektioon assosioituvien liitännäissairauksien ilmaantumisen kanssa. Näiden syiden vuoksi se tarjoaa houkuttelevan tutkimuskohteen uusien hoitostrategioiden kehitykselle.

Tässä tutkielmassa on paneuduttu HIV-infektion perusmekanismeihin ja erityisesti syvennytty tyrosiinikinaasi Hck:n rooliin kroonisen immuuniaktivaation kehittymisessä. Kokeellinen osuus keskittyy Hck:lle spesifisten inhibiittorimolekyylien ominaisuuksien karakterisointiin. Tutkimuksessa selvitettiin inhibiittorien toimivuutta ja spesifisyyttä elävässä solumallissa verrattuna muihin Src-perheen tyrosiinikinaaseihin.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 HI-virus

HI-virus on lentiviruksiin kuuluvan retrovirus. Immuunikatoviruksia tunnetaan useita eri nisäkäslajeissa, ihmisellä HIV-1 ja HIV-2. Globaalin HIV-epidemian valtaviruksena esiintyy HIV-1:n M-alatyypin. HI-virukset ovat läheistä sukua useilla eri apinalajeilla esiintyvillä immuunikatoviruksille, joita kutsutaan yleisesti SI-viruksiksi. Nykyisen HIV-1 M-alatyypin kantamuodon ajatellaan siirtyneen ihmiseen SIV-tartunnan seurauksena viimeistään 1900-luvun alkupuoliskolla (4) ja hankinnallisen immuunikadon (AIDS) aiheuttajana se on tunnettu 1980-luvulta lähtien (5).

Rakenteeltaan HI-viruspartikkeli on pyöreähkö. Sen päällimmäinen kerros muodostuu lipidivaipasta, josta työntyy glykoproteiini gp41 ja siihen assosioituva gp120. Lipidivaipan alla on p17-matriksiproteiinin muodostama matriksi. Sisempänä sijaitsee p24-kapsidiproteiinista muodostuva kuorirakenne, jonka sisällä sijaitsee viruksen genomi. Viruksen ytimessä genomien lisäksi sijaitsee viruksen toiminnalle tärkeitä entsyymejä, jotka ovat oleellisia viruksen toiminnalle infektoituneessa isäntäsolussa (4).

HI-virus infektoi pääasiassa soluja, jotka ilmentävät solukalvolla CD4:ää. Merkittävimmät virustaakan, ainakin sairauden alkuvaiheessa, kantavat CD4-positiiviset T-solut. Solun infektoituminen alkaa, kun viruspartikkelin pinnalla oleva vaippaproteiini gp120 tarttuu kohdesolun solukalvolla sijaitsevaan CD4:ään. Tämä aikaansaa gp120:ssä konformaatiomuutoksen, jonka seurauksena gp120 voi edelleen sitoutua koreseptorina toimivaan kemokiinireseptoriin. Em. kahden sitoutumisen jälkeen gp120:n kanssa kompleksin muodostanut gp41 tarttuu myös kohdesoluun ja käynnistää viruspartikkelin lipidivaipan ja infektoituneen solun solukalvojen fuusion (4).

Soluun tunkeuduttuaan alkaa välittömästi genomien käänteiskopiointi. Solulimassa genomi on sitoutuneena lukuisiin virusproteiineihin. Genomi tunkeutuu tumaan hyödyntäen solun omia kuljetusmekanismeja, minkä seurauksena virus voi infektoida myös soluja, jotka eivät enää jakaudu. Viruksen genomista muokataan lineaarinen kaksisäikeinen DNA-kopio, joka

integroituu isäntäsolun genomiin sattumanvaraiseen kohtaan, jonka jälkeen sitä kutsutaan provirukseksi.

Provirus käyttää geenituotteidensa ilmentämiseen isäntäsolun omia transkriptiomolekyylejä. Transkriptionsa tehostamiseen se käyttää sekä omia proteiinituotteitaan (Tat) sekä osin solun transkriptiotekijöitä (4).

## 2.2 HIV-infektion eteneminen

HIV-infektion alkuvaiheessa HI-virus infektoi määrällisesti eniten CD4-positiivisia T-soluja. Nykykäsityksen mukaan HI-viruksen replikaatio on suurinta suoliston limakalvon imukudoksessa (GALT). Virus infektoi limakalvolla aktivoituneita CD4-positiivisia T-soluja, mutta myös lepääviä CD4-positiivisia T-soluja, joiden aktivoitumista tehokkaaseen virustuotantoon asti etenevä infektio kuitenkin edellyttää. Nopeasti leviävä infektio johtaa runsaaseen viruksen replikaatioon, mikä edistää infektion etenemistä muihin runsaasti CD4-positiivisia T-soluja sisältäviin kudoksiin, kuten kateenkorvaan, imusolmukkeisiin ja pernaan (4,6).

Kliinisesti runsas virusreplikaatio ja runsas infektoituneiden solujen määrä ilmentyy akuuttina HIV-syndroomana, jonka oireina esiintyy mm. yleistynyttä lymfadenopatiaa, kuumeilua sekä ripulia (4). Virusten määrä verenkierrossa saavuttaa huippunsa 3-4 viikon kuluttua (7). Nopean virusreplikaation vaiheeseen liittyy myös runsas CD4<sup>+</sup> T-solujen määrän putoaminen verenkierrossa sekä GALT:ssa. Tämä selittyy osin HIV-infektion sytotoksisuudella ja soluvälitteisen anti-HIV immunitetin tappovaikutuksella, mutta myös epäsuorilla mekanismeilla esim. kuolevien solujen laukaistessa apoptoosia myös ympäröivissä ei-infektoiduissa soluissa, mutta aivan tarkkaa mekanismia CD4 solutuholle ei kuitenkaan tunneta (2,6).

Virusten määrä verenkierrossa saavuttaa huippunsa noin 30 vuorokauden kuluttua infektiosta. Tämän jälkeen virusten lukumäärä alkaa laskea. Osittain laskun uskotaan olevan seurausta CD4<sup>+</sup>-solujen lukumäärän laskusta. Muita mekanismeja ovat näihin aikoihin vereen ilmaantuvat HIV:lle spesifiset vasta-aineet sekä HIV:lle spesifiset CD8<sup>+</sup> T-solut. HI-virus kuitenkin muuntautuu elimistössä nopeasti ja kykenee siksi välttämään

eradikoitumisen (2). Lopulta viruksen pitoisuudet tasoittuvat. Tasoittumisen aikana ilmeisesti muodostuu dynaaminen tasapainotila viruksen infektoimien solujen ja viruksen määrän välille. HIV infektoi soluja ja aiheuttaa solukatoa samaan tahtiin kuin korvaavia soluja syntyy. Potilaasta riippuen tämä kroonistuneesta taudista kertova tasainen viruspitoisuus voi olla korkeampi tai matalampi ja se korreloi vahvasti sairauden etenemisen suhteen (4). Hoitamattomana HIV-infektio johtaa lopulta CD4<sup>+</sup>-solujen katoamiseen ja AIDS:lle ominaisiin opportunistisiin infektioihin. Lisäksi HIV-infektio altistaa kantajansa erilaisille maligniteeteille ja muille liitännäissairauksille, joiden riski ei täysin katoa tehokkaasta antiviraalisesta lääkityksestä huolimatta. Syitä liitännäissairauksien kehittymiselle ei täysin tunneta, mutta kroonisen immuunivajeen ohella vaikutusta on arveltu olevan HIV-infektiolle tyypillisellä kroonisella immuuniaktivaatiolla sekä pitkään jatkuneella antiviraalisella lääkityksellä (2).

### 2.3 HIV-infektion kroonistuminen ja viruksen reservoaarit

Tehokkaasta antiviraalisesta lääkityksestä huolimatta HIV-infektion juuriminen elimistöstä on osoittautunut erittäin haastavaksi tehtäväksi. Nykyisin käytössä olevalla tehokkaalla antiretroviraalilääkityksellä saadaan nopeasti potilaan virustasot verestä mittaamattoman matalaksi(4). Tästä huolimatta virusmäärät palaavat veressä nopeasti aiemmalle tasolle, jos vuosiakin käytössä ollut tehokas antiviraalinen lääkehoito tauotetaan (8-10). Viremian uusiutumisen ja infektion kroonistumisen merkittävänä tekijänä pidetään pitkäikäisten virusreservoaarien muodostumista elimistön eri osiin.

Merkittävää näyttöä CD4<sup>+</sup>-solujen muodostamista virusreservoaareista on tarjolla runsaasti (11). Anatomisesti merkittävä T-solujen muodostama virusvaranto sijaitsee ruoansulatuskanavan imukudoksessa. Vaikka GALT:n CD4<sup>+</sup>-solujen määrä romahtaa infektion seurauksena, voidaan viruksen DNA:ta todeta vuosienkin kuluttua antiviraalisen lääkityksen käytöstä huolimatta (12). GALT:ssa mahdollisia HI-virusta ylläpitäviä tekijöitä ovat mahdollisesti viruksen leviäminen solusta soluun sekä lepäävien solujen provirusta säilövä vaikutus. Viruksen aktiivinen leviäminen solusta soluun on yhdistetty kudoksessa aktiivisten CD8<sup>+</sup>-solujen määrään, joka kertoo myös aktiivisista CD4<sup>+</sup>-soluista. Tämän perusteella aktiivinen solusta soluun leviävä infektion näyttää olevan merkittävässä osassa

reservoarin ylläpidossa (13). Aktivoituneiden ja virusta aktiivisesti erittävien T-solujen lisäksi osa T-soluista ajautuu infektion jälkeen lepotilaan. T-soluista kuitenkin vain noin 1 % siirtyy lepovaiheeseen infektion seurauksena. Tämän vuoksi T-solujen muodostama todellinen latentti virusreservoari on absoluuttiselta solumäärältään melko pieni (4).

CD4<sup>+</sup> T-solujen lisäksi HI-virus infektoi tehokkaasti myös makrofageja (14,15). CD4<sup>+</sup> T-soluista poiketen makrofagilinjan solut kuitenkin sietävät HIV-infektiota T-soluja paremmin, minkä vuoksi makrofagit ovat merkittävässä asemassa pitkäaikaisten virusreservoarien muodostumisessa (16). Pitkäikäisyytensä lisäksi makrofageja esiintyy elimistön kaikissa kudoksissa. Laajan levinneisyytensä vuoksi ne voivat toimia HI-viruksen kantajina sekä levittäjinä myös sellaisissa elimistön osissa, joihin lääkaineilla on vaikeuksia penetroida, kuten keskushermostossa (14). Infektoituneilla makrofageilla näyttää olevan myös vaikutusta CD4<sup>+</sup>-solujen muodostaman latentin virusreservoarin syntymisessä. Infektoituneet makrofagit erittävät sytokiineja, jotka houkuttelevat sekä aktivoivat CD4<sup>+</sup>-soluja laajentaen infektoitunutta solupopulaatiota (17). Lisäksi makrofagien ja CD4<sup>+</sup>-solujen välinen vuorovaikutus suojaa infektoituneita T-soluja apoptoosilta (18). Makrofagit myös näyttävät edistävän infektoitumattomien T-solujen apoptoosia toimien näin osana HIV-infektion patogeneesiä (17).

## 2.4 HIV-infektio ja krooninen immuuniaktivaatio

Paradoksaalisesti HIV-infektioon liittyy syvän immuunikadon ohella krooninen immuuniaktivaatio. Nämä sairauden ilmentyvät todennäköisesti ovat läheisesti kytköksissä toisiinsa ja immuuniaktivaation arvellaan olevan CD4<sup>+</sup> T-solujen laajamittaisen ehtymisen merkittävä taustavoima, vaikka selkeää kausaalista linkkiä näiden välillä ei ole vielä voitu osoittaa (3).

Infektion aiheuttaman immuuniaktivaation ensimmäinen merkki ja kliininen ilmenemismuoto on hypertrofinen lymfadenopatia, jota ilmenee jo infektion alkuvaiheessa akuutin HIV-syndrooman yhteydessä (4,5). Verenkierrossa voidaan todeta aktivoituneiden CD4<sup>+</sup> ja CD8<sup>+</sup> T-solujen määrän nousseen, tällä ilmiöllä näyttää olevan vahva ennustearvo myöhemmän CD4<sup>+</sup> T-solukadon nopeuden kanssa (19-21). Infektion seurauksena nähdään myös B-solulinjan solujen aktivaatiota, minkä seurauksena vasta-ainevälitteinen



immuunivaste häiriintyy (22). Luonnollista immuunivastetta välittävät solut näyttävät aktivoituvan HIV-infektion seurauksena. Monosyytit ja makrofagit osoittavat hyperaktivaation merkkejä ja niiden kyky fagosytoosiin on heikentynyt. Dendriittisoluista esiintyy immuuniaktivaation seurauksena poikkeavia muotoja. NK-solut kärsivät myös dysfunktioista: niiden tuottamat sytokiinit ja hakeutuminen kudoksiin eroavat terveistä verrokeista (23-25). Lisäksi verenkierrosta voidaan todeta useita immuuniaktivaatiota osoittavia merkkiaineita. Esimerkkeinä näistä mainittakoon neopteriini, TNF- $\alpha$  ja CRP, joiden pitoisuudella on korrelaatio sairauden etenemisen kanssa (3).

HI-viruksen aiheuttaman immuuniaktivaation taustalla vaikuttavaa tarkkaa mekanismia lukuisista yrityksistä huolimatta ei ole onnistuttu täysin selvittämään. On kuitenkin esitetty lukuisia erilaisia malleja, jotka todennäköisesti kaikki näyttelevät roolia immuunijärjestelmän toiminnan häiriintymisessä. Hoitostrategioiden suunnittelua vaikeuttaa entisestään se, että eri mekanismien painottuminen potilaiden välillä voi vaihdella (3).

Suoraviivaisin immuuniaktivaation mekanismi selittyy immuunijärjestelmän normaalilla HI-virukseen kohdistuvalla torjuntareaktiolla, joka nähdään jo sairauden alkuvaiheessa. Virusspesifejä antigeenireseptoreja ja pinta-immunoglobuliineja ilmentävät T- ja B-solut aktivoituvat niiden kohdatessa HI-viruksen. Lisäksi HI-virus voi sitoutua suoraan vieraita rakenteita tunnistaviin ns. hahmontunnistusreseptoreihin, kuten Toll-like -reseptoreihin (26). Myös viruspartikkelin tunkeutuminen infektoitavaan isäntäsoluun voi toimia solua aktivoivana tapahtumana. Pelkkä viruksen suora immuunijärjestelmää aktivoiva vaikutus ei kuitenkaan selitä kroonisessa taudissa nähtävää systeemistä immuuniaktivaatiota, sillä aktivoituneiden T-solujen määrä ylittää selkeästi infektoituneuden CD4<sup>+</sup> ja HIV-spesifisten T-solujen määrät. Lisäksi aktivaatiota nähdään myös muissa solupopulaatioissa (3,27,28).

HI-viruksen tuottamat apuproteiinit kuten Nef ja Tat ovat mahdollisia tekijöitä kroonisen immuuniaktivaation synnyssä. HIV-1:n Nef-proteiini ei kykene SIV:n ja HIV-2:n Nef:n tavoin vähentämään CD3-TCR -kompleksin ilmentymistä solun pinnalla. Tämän seurauksena

infektoitunut CD4<sup>+</sup> T-solu herkistyy stimulaatiolle T-solureseptorin kautta lisäten infektoidun solun aktivaatiota (29).

Latenttien kroonisten infektioiden reaktivaatio tarjoaa myös mekanismin immuuniaktivaation ylläpidolle. CD4<sup>+</sup> T-solujen määrän romahtaminen mahdollistaa piilevien infektioiden, kuten EBV ja CMV, aktivoitumisen. Sytomegaloviruksen reaktivaation on todettu lisäävän immuuniaktivaatiota ja inflammaatiota (27). CMV-reaktivaatio ennustaa detektorajan alapuolelle antiretroviraalilääkityksellä lääkittyjen HIV-potilaiden mortaliteettia. CMV-reaktivaation lääkitsemisen on myös havaittu vähentävän aktivoituneiden CD8<sup>+</sup> T-solujen tasoa (30). Immuuniaktivaatiovaikutuksen lisäksi sytomegaloviruksen reaktivaatio yhdistyy myös lisääntyneeseen kardiovaskulaarisairastuvuuteen kroonista HIV-infektiota sairastavilla (31). Sairauden loppuvaiheessa opportunistiset infektiot voivat myös toimia immuuniaktivaatiota ylläpitävästi (3).

GALT toimii merkittävänä HI-viruksen replikaatiopaikkana, varsinkin infektion alkuvaiheessa. Infektion ensiviikkojen aikana GALT:ssa tapahtuva massiivinen CD4<sup>+</sup> T-solujen kato johtaa suolen epiteelisolujen ja soluväliliitosten häiriintymiseen ja siten suolen seinämän barrierifunktion pettämiseen. Barrierin pettäessä suolen luumenissa elävien sienien ja bakteerien komponentteja sekä aineenvaihduntatuotteita kuten peptidoglykaaneja, lipopolysakkarideja ja ribosomaalista DNA:ta päätyy systeemiseen kiertoon. Nämä mikrobiperäiset molekyylit aktivoivat Toll-like -reseptoreja johtaen proinflammatoristen välittäjäaineiden kuten TNF- $\alpha$ :n eritykseen. TNF- $\alpha$  vuorostaan lisää enterosyyttien apoptoosia johtaen suolen barrierin lisävaurioon ylläpitäen immuunijärjestelmää aktivoivaa prosessia (32,33). Teoriaa barrierifunktion häiriintymisen merkittävästä immuuniaktivaatiota ylläpitävästä roolista tukee havainnot SI-viruksella infektoiduneista apinalajeista, joilla ei voida todeta systeemistä immuuniaktivaatiota eikä merkkejä suolen barrierifunktion häiriintymisestä (34).

Immuuniaktivaatioon vaikuttaa myös tiettyjen CD4<sup>+</sup> T-solujen alatyypin katoaminen. Th17-solut ovat GALT:n alueella suhteellisesti eniten HIV-infektiosta kärsivä T-solujen

alatyypin. Näiden solujen tuottama IL-17 ja IL-22 rekrytoivat fagosyyttejä ja edistävät epiteelin korjaantumista, minkä vuoksi ne ovat oleellisia suolen limakalvon barrierifunktion ylläpidolle (35). Imusolmukkeissa sijaitsevat sentraaliset CD4<sup>+</sup> T-muistisolut (TCM) muodostavat merkittävimmän T-solureservoarin HI-virukselle. Ne säätelevät T-solujen uusiutumista tuottamalla lyhytikäisempiä perifeerisiä T-muistisoluja. TCM solupopulaation infektoituminen voi lisätä immuuniaktivaatiota kiihdyttämällä T-solujen vaihtuvuutta (*turnover*). Lisäksi TCM solujen anatominen sijoittuminen imusolmukkeisiin immuunivasteen kannalta tärkeisiin ”johtokeskuksiin” lienee merkittävä osa voimakkaampaa immuunivastetta sen ohella, että imusolmukkeissa TCM solut sijaitsevat tiiviisti mahdollistaen nopeasti etenevän ja paikallisesti voimakkaan infektiotapahtuman (36). Epäselvää roolia immuuniaktivaation ylläpidossa näyttelevät säätelijä-T-solut ja follikulaariset auttaja-T-solut. Kokonaisuutena HIV-infektio näyttää kuitenkin muuttavan eri T-solupopulaatioiden suhteita tavalla, joka edistää ja ylläpitää immuuniaktivaatiota sekä immuunipuutosta (3).

Viimeaikainen tutkimus on antanut viitteitä ekstrasellulaaristen vesikkelien roolista kroonisen immuuniaktivaation välittäjinä. Tehokkaan antiviraalisen lääkehoidon aikana, jolloin veren virustasot ovat havaitsemisrajan alapuolella, voidaan kuitenkin eristää runsain määrin HI-viruksen infektoimista soluista peräisin olevia kalvorakkuloita. Nämä rakkulat sisältävät runsaasti proinflammatorisia molekyylejä kuten ADAM17:ta ja TNF:ää. Lisäksi rakkuloissa on havaittu HI-viruksen apuproteiineja kuten Nef ja Vpu, joiden proteiinisynteesin on aiemmin ajateltu estyneen tehokkaan antiviraalisen lääkehoidon aikana (37). Vesikkeleiden on todettu aiheuttavan TNF:n vapautumista niiden päädyttyä myeloidisen linjan soluihin. Lisäksi voidaan olettaa, että runsas vesikkeleiden soluunotto aiheuttaa kohdesolussa toiminnallisia muutoksia kohti inflammatorista fenotyyppiä, joka on HIV-infektioille tyypillinen. Antiviraalisesta lääkityksestä huolimatta jatkuva vesikkelieritys kertoo, että vesikkelien alkuperä on mahdollisesti peräisin T-solupopulaation ulkopuolelta. Vesikkelien CCF-profiili (cytokine/chemokine/soluble factor) ei myöskään tukenut alkuperää T-soluissa, jolloin on mahdollista, että vesikkelien alkuperä on myeloidisessa solulinjassa (38).

## 2.5 HIV:n apuproteiinit ja Nef

HI-viruksen genomi koodittaa viruspartikkelin rakenneproteiinien lisäksi kuutta muuta proteiinia: Tat, Rev, Vif, Vpu, Vpr ja Nef. Tat ja Rev ovat virusreplikaatiota sääteleviä proteiineja. Vif, Vpu, Vpr ja Nef ovat ns. apuproteiineja, jotka eivät ole välttämättömiä viruksen replikaatiolle. Sen sijaan ne tehostavat viruksen kykyä harhauttaa isännän immuunijärjestelmää ja optimoivat viruksen replikaatiota sekä infektiotapahtumaa (4).

Vif estää virukseen kohdistuvaa intrasellulaarista torjuntaa ohjaamalla APOBEC3-proteiineja hajotukseen. Vpu vähentää CD4:n ilmentymistä isäntäsolun pinnalla ohjaamalla CD4:n hajotukseen. Lisäksi Vpu tehostaa jo muodostuneiden viruspartikkelien vapautumista isäntäsolusta. Vpr lisää HI-viruksen kykyä infektoida makrofageja ja se vaikuttaa isäntäsolun jakautumissyklin etenemiseen (4).

Nef on noin 30 kDa painoinen proteiini. Se koostuu taipuisasta myristyloituneesta N-terminaalisesta osasta, joka mahdollistaa vuorovaikutuksen erilaisten kalvorakenteiden kanssa, laskostuneesta ydinosasta, jonka sisällä on myös joustava rakenne sekä C-terminaalisesta domeenista. Proteiinin joustavat osat voivat läpikäydä erilaisia konformaatiomuutoksia sekä vuorovaikuttaa lukuisten isäntäsolun proteiinien kanssa (39).

Infektoidussa solussa Nef kaappaa isäntäsolun kuljetuskoneiston ja vaikuttaa solukalvolla ilmentyviin proteiineihin merkittävästi. Nef vähentää solukalvolla esiintyvän CD4:n määrää merkittävästi, minkä ajatellaan estävän solun superinfektiota ja tehostavan solusta irtautuvien viruspartikkelien virulenssia estämällä Env-CD4 välisiä haitallisia interaktioita (40,41). Myös MHC-I:n määrä solukalvolla laskee Nef:n vaikutuksesta, mikä heikentää tappaja T-solujen kykyä tunnistaa infektoituneita soluja (42). Nef myös lisää suoraan infektoituneesta solusta irronneiden viruspartikkeleiden infektiivisyyttä hävittämällä isäntäsolun solukalvolta proteiinit SERINC3 ja SERINC5, jotka solusta kuroutuvaan viruspartikkeliin jäädessään heikentävät viruspartikkelin kykyä infektoida muita soluja (43).

Solukalvon proteiiniprofiilin muuntelun lisäksi Nef vaikuttaa infektoituneista soluista kuroutuvien kalvorakkuloiden eritykseen ja sisältöön. Nef näyttää kiihdyttävän kalvorakkuloiden kuroutumista (39). Nef ja lukuisia muita proteiineja erittyy näihin

mikrovesikkeleihin ja ne näyttävät vaikuttavan HIV-infektion patogeenesiä edistävästi. Nef:n kulkeutuminen soluihin, jotka ovat infektoituneet HI-viruksen kannalla, joka on menettänyt Nef geeninsä, voi palauttaa tämän viruksen infektiotehokkuuden lähes villityyppiä vastaavalle tasolle (44). Nef:iä sisältävät kalvorakkulat vaikuttavat olevan merkittävä tekijä HIV-infektioon liittyvässä kroonisessa immuuniaktivaatiossa (38).

Lukuisten proteiinivuorovaikutustensa vuoksi Nef näyttäytyy houkuttelevana kohteena uusille terapiastrategioille HIV:n hoidossa. Nef on kuitenkin molekyylinä verraten kookas ja siinä on lukuisia aktiivisia proteiinivuorovaikutusta edistäviä alueita, joten sen inhiboiminen on osoittautunut haastavaksi tehtäväksi. Siksi onkin perusteltua identifioida Nef:n kohdeproteiineja, joiden aktivaatio johtaa patologisiin prosesseihin. Yksi tällainen kohderyhmä on Src-perheen tyrosiinikinaasit, kuten Hck, jota esiintyy huomattavia määriä HIV-infektion kohdesoluissa, makrofageissa.

## 2.6 Proteiinien toiminnallinen säätely

Proteiinien toiminnallista säätelyä voidaan toteuttaa useilla eri tavoilla. Esimerkkinä tästä on reversiibeli sitoutuminen toiseen molekyylin, mikä voi muuttaa säädeltävän proteiinin avaruudellista rakennetta johtaen toiminnalliseen muutokseen. Tavallinen muoto em. säätelymenetelmästä on fosfaattiryhmän liittäminen säädeltävään proteiinin. Liitetty fosfaattiryhmä voi yksinään sähköisen varauksensa avulla muuttaa proteiinin konformaatiota tai se voi tarjota toiselle molekyylille aktiivisen sitoutumiskohdan. (45)

Fosforylaatiosta vastaavat proteiinit kuuluvat proteiinikinaaseihin, joita koodaavia geenialueita tunnetaan ihmisen perimässä yli 500 kappaletta. Tyypillistä on, että proteiinikinaasit tunnistavat tiettyjen aminohappojen sivuketjut. Tämän spesifisyyden perusteella proteiinikinaaseja on jaoteltu perheisiin, kuten tyrosiinikinaasit, joihin kuuluvat mm. Src-tyrosiinikinaasit (Src family kinases, SFK). (45)

## 2.7 Src-tyrosiinikinaasit

Src-perheen tyrosiinikinaasit kuuluvat sytoplasmisiin tyrosiinikinaaseihin. Perheestä tunnetaan 10 erilaista kinaasia (Src, Yes, Fgr, Fyn, Lyn, Hck, Lck, Blk, Frk sekä Yrk). Src, Yes, Fgr sekä Fyn esiintyvät laajasti eri kudoksissa. Lyn, Hck, Lck ja Blk ilmentyvät pääosin

hematopoieettisissa soluissa. Src-perheen kinaasit voivat sijaita solun kalvorakenteissa tai solulimassa. (45,46)

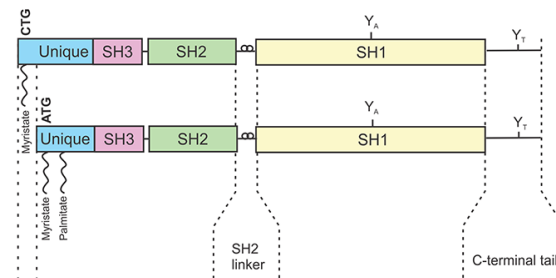
Src-perheen tyrosiinikinaasien perusrakenne koostuu N-terminaalisesta osasta (SH4) sekä tätä seuraavista SH3 ja SH2 domeeneista ja varsinaisesta katalyyttisestä kinaasiosasta (SH1). N-terminaalinen pää toimii ankkurina, jonka avulla proteiini voi kiinnittyä solun sisäisiin kalvorakenteisiin. (45) Ankkuritoimintojen lisäksi N-terminaalinen pää osallistuu kullekin Src-perheen jäsenelle ominaisten kohdemolekyylien tunnistamiseen. (46)

## 2.8 Hck:n rakenne ja säätely

Src-tyrosiinikinaaseihin kuuluva Hck (Hematopoietic cell kinase) ilmentyy etenkin myeloidisissa sekä B-linjan soluissa. Ihmisen elimistöstä on tunnistettu kaksi isoformia p61HCK sekä p59HCK, jotka sisältävät 525 ja 504 aminohappotähdettä. Nämä isoformit ovat saman geenin koodaamia ja muodostuvat saman mRNA:n vaihtoehtoisesta transkriptiosta. Isoformien rakenteelliset erot painottuvat molekyylin N-terminaaliseen domeenirakenteeseen, minkä seurauksena kyseiset isoformit jakautuvat soluissa eri lokalisaatioihin toisen esiintyessä pääosin lysosomeissa ja toisen solukalvolla. (47)

Perustilassa Hck on inaktiivisessa muodossa, jolloin sen konformaatio vastaa em. Src-kinaasiperheen inaktiivista muotoa: SH2 on sitoutunut fosforyloituneeseen C-terminaaliseen tyrosiinitähteeseen  $Y_T$ , SH3 on kiinnittynyt SH1:n ja SH2:n väliseen peptidiketjuun ja SH1:n katalyyttisellä alueella sijaitseva tyrosiinitähti  $Y_A$  on fosforyloimaton. Hck:n inaktiivista muotoa ylläpitävät transmembranoottinen reseptorin kaltainen fosfataasi CD45, joka defosforyloi  $Y_A$ :ta sekä C-terminaalinen SRC-kinaasi, CSK, joka fosforyloi  $Y_T$ :n. Vaihtoehtoisesti CSK:n katalysoimaa fosforylaatiota voi toteuttaa myös CHK. CD45 esiintyy yksinomaan hematopoieettisissa soluissa, CSK:ta ilmentyy laajasti eri solupopulaatioissa ja CHK:ta esiintyy vain hermosoluissa sekä hematopoieettisissa soluissa. CHK toimii myös Hck:n luonnollisena inaktivaattorina muodostamalla Hck:n kanssa vakaa kompleksin. Hck:n aktivoivia ärsykeitä ovat esim. sytokiinit, joiden vaikutuksesta esim. CD45 katalysoi  $Y_T$ :n defosforylaation, mikä johtaa CHK:n asettumiseen aktiiviseen

konformaatioon. Tietyissä tilanteissa Hck voi aktivoitua myös ilman katalysoitua defosforylaatiota (47).



Kuva 1 Kaavamainen esitys Hck:n rakenteesta

## 2.9 Hck ja HIV

Hck:ta ilmentävät hematopoieettisen solulinjan solut, kuten makrofagit, muodostavat merkittävän HI-viruksen infektiokohteen ja sairauden kroonisessa vaiheessa virusreservoarin. Täten Hck näyttelee myös merkittävää roolia HIV-infektion ja AIDS:n patogeneesissä. Kuvaavaa Hck:n merkitykselle ovat havainnot hiirimalleista, joissa poistogeeniset Hck:ta ilmentämättömät hiiret kehittivät AIDS:n kaltaisen tilan huomattavasti verrokkeja hitaammin myös kuolleisuuden ollessa alhaisempi, kun ne risteytettiin Nef-transgeenisten hiirien kanssa. Vastaavasti Nef:n toimintakyvyttömäksi saattaminen PxxPxR peptidiäihion mutaatiolla esti tyystin AIDS:n kaltaisen tilan kehittymisen Nef-transgeenisissä hiirissä (48).

Hck:n Nef-välitteinen aktivaatio tapahtuu ilmeisesti allosteerisen mekanismin kautta Hck:n ja Nef:n muodostaessa kompleksin. Nef sitoutuu Hck:n SH3-domeeniin. Nef:n toiminnalle tärkeä PxxPxR-aiho muodostaa Hck:n ligandeille tyypillisen helix-rakenteen. Lisäksi Nef:n  $\alpha A$ - ja  $\alpha B$ -helixit muodostavat hydrofoobisen taskun vuorovaikuttaen SH3:n kanssa. Sitoutumisen seurauksena SH3 siirtyy pois sen inaktiivisesta asemasta johtaen katalyyttisen osan aktivoivaan muodonmuutokseen (49,50).

Hck-aktivaation tarkka merkitys HIV-infektiossa on edelleen hämärän peitossa, mutta viimeaikainen tutkimus on paljastanut sen merkittäväksi tekijäksi proinflammatorisia yhdisteitä sisältävien kalvovesikkeleiden erityksessä kroonista HIV-infektiota sairastavilla potilailla (38). Hck:ta on voitu eristää HI-viruksella infektoituneiden potilaiden periferisestä

verestä eristetyistä kalvorakkuloista, samoista rakkuloista on myös eristetty runsaasti Nef:iä, mikä viittaa Nef:n Hck:ta aktivoivaan rooliin rakkuloiden vapautumisessa. Samojen kalvorakkuloiden on myös todettu sisältävän proteaasi ADAM17:ta. Nef:n Hck:ta aktivoiva ja rakkuloiden erittymistä lisäävä vaikutus on saanut myös lisätukea kokeissa, joissa Hck:ta ilmentäviin soluihin on viety toimimatonta PxxP-peptidiahiota sisältävä Nef:n muoto, jolloin ADAM17:ta sisältävien kalvorakkuloiden eritystä ei ole voitu todeta. Mielenkiintoisena lisähavaintona kalvorakkuloiden CCF-profiilia tarkastelemalla rakkuloiden alkuperä saattaa ainakin osin olla maksakudoksessa aiemmin pääasiallisesti esitetyn myeloidisen alkuperän sijaan. Rakkuloiden alkuperää maksakudoksessa tukee havainto Hck:n ilmentymisestä HIV-positiivisen potilaan maksakudoksessa hepatosyyteissä, jotka eivät normaalitilanteessa ilmennä Hck:ta. Samoissa soluissa voitiin myös havaita runsaasti Nef:ä, minkä perusteella on mahdollista, että Hck:ta aktivoivan vaikutuksen lisäksi Nef myös aikaansaa Hck:n ekspressiota sellaisissa kudoksissa, jotka eivät Hck:ta normaalisti ilmennä. On kuitenkin huomattava, että maksasolut tuottavat proinflammatorisia vesikkeleitä myös muissa sairauksissa, minkä vuoksi täyttä varmuutta ei ole siitä onko kyseessä mahdollisesti ainakin osittain epäsuora reaktio HIV-infektioon viruksella infektoitumattomista soluista (51).

## 2.10 Hck-inhibiittorit ja merkitys muissa sairauksissa

HIV-infektion lisäksi Hck näyttelee roolia useissa leukemioissa, kuten kroonisessa myeloidisessa leukemiassa, kiinteissä tuumoreissa kuten rintasyövässä ja kolorektaalisyövässä. Hck:n kohonnut aktiviteetti yhdistyy näissä sairauksissa heikompaan ennusteeseen. Hck:n toiminta johtaa kasvutekijöiden ja proinflammatoristen välittäjäaineiden erittymiseen ja makrofagien erilaistumiseen tuumorin selviämistä tukevaan fenotyyppiin. Kasvaimissa Hck välittää ekstrasellulaarisen matriksin hajottamista ja kudosisvaasiota tukevia tapahtumia. Hck vaikuttaa syöpäsairauksissa myös sytostaattien tehoa heikentävästi (47).

Hck:n kuten myös muiden Src-perheen tyrosiinikinaasien rakenne on hyvin tunnettu ja se tarjoutuu houkuttelevana kohteena täsmälääkkeille. Hck-Nef-kompleksin tutkiminen on johtanut tarkempaan ymmärrykseen paitsi Hck:n toiminnasta mutta myös sen toimintaa



salpaavien molekyylien kehitykseen Nef:n läsnäollessa. Esimerkkinä mahdollisista inhibiittorimolekyyleistä difenyylifuropyrimidiini (DFP) analogit estävät Hck:n Nef-riippuvaista aktivaatiota ja HI-viruksen replikaatiota (52). DFP-analogit sitoutuvat Hck:n katalyyttiseen taskuun, joka paljastuu Hck-Nef kompleksin muodostuessa. Lisävahvistusta tälle olettamukselle on saatu Hck variantista, jossa katalyyttistä sekä hydrofobista taskua suojaava treoniini on korvattu pienemmällä alaniinilla sallien DFP-analogin tehokkaan sitoutumisen (49).

Src-perheen tyrosiinikinaasien, kuten Hck:n, merkitys lukuisissa sairaustiloissa on jatkuvan tutkimuksen kohde. Molekulaaristen mekanismien paljastuminen tarjoaa jatkuvasti mahdollisuuksia uusien hoitostrategioiden kehittämiseen. Src-perheen tyrosiinikinaasien samankaltainen rakenne suhteessa toisiinsa aiheuttaa kuitenkin omat haasteensa selektiivisten molekyylien kehittämisen kannalta, sillä spesifiin molekyyliin kohdistuvien hoitojen haitat ovat myös potentiaalisesti vähäisempiä kuin laajemmalle vaikuttavien lääkeaineiden. Lukuisat tässä kirjallisuuskatsauksessa esitetyt mekanismit HIV-infektion patogeneesin taustalla perustuvat tyrosiinikinaasi Hck:n poikkeavaan aktivaatioon ja toimintaan, mikä osaltaan kuvaa Hck:n aktivaatiota estävien lääkemolekyylien tunnistamisen ja karakterisoinnin tärkeyttä.

### 3 Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on karakterisoida Src-perheen tyrosiinikinaasi Hck:ta kohtaan kehitetyn kahden uuden inhibiittorimolekyylin RM-1-87 ja RM-1-183 kykyä inhiboida Hck:n kinaasiaktiivisuutta elävissä soluissa sekä niiden spesifisyyttä Hck:n inhibitioon verrattuna muiden Src-perheen tyrosiinikinaaseihin. RM-1-87 ja RM-1-183 ovat valikoituneet tutkittavaksi Dustin Malyn ryhmän tekemien in vitro -inhibitioanalyysien perusteella Washingtonin yliopistossa. Toimiessaan ne voisivat soveltua mm. HIV-infektioon liittyvän kroonisen immuuniaktivaation hoitoon niiden Hck:n aktivaatiota inhiboivan vaikutuksensa vuoksi.

## 4 Aineisto

Tämän tutkimuksen kirjallisuuskatsauksen aineistona on käytetty PubMed-tietokannan kautta haettuja tieteellisiä julkaisuja sekä soveltuvia oppikirjoja. Aineistoon valittiin kattavasti HI-virusta, HIV-infektiota ja HIV-infektion proteiinikemiaa käsitteleviä artikkeleita riittävän teoreettisen pohjan luomista varten sekä tutkimusaiheen sitomiseksi laajempaan HIV-tutkimuksen viitekehykseen. Kirjallisuuskatsausta varten käytetty kirjallisuus on ilmoitettu kokonaisuudessaan tämän tutkimuksen lähdeviitteissä. Tutkimuksen menetelmäosuudessa yleisesti käytössä olevat menetelmät on lähdeviitotettu alkuperäisjulkaisuun, jossa kyseinen menetelmä on ensimmäisen kerran kuvattu. Tutkimuksen kokeellisen osuuden tulokset on tuottanut tämän tutkimuksen tekijä, ellei muuta ole ilmoitettu.

## 5 Menetelmät

### 5.1 Solujen viljely

Tutkimuksessa käytettäväksi solumalliksi valittiin ihmisen munuaisen sikiökautisista kantasoluista peräisin oleva solulinja 293T. Solulinjan valintaan vaikuttivat sen nopeakasvuisuus, viljelmän helppo ylläpidettävyyys sekä suotuista ominaisuudet transfektioiden toteuttamisen kannalta. Soluja ylläpidettiin 10 cm kasvatusmaljoilla. Elatusliuoksena käytettiin Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), johon lisättiin 10 vol% Fetal Bovine Serum (FBS), 2 vol% glutamiini ja bakteerikasvun estoon penisilliini-streptomysiini. Soluviljelmän solut jaettiin uusille elatusmaljoille kahdesti viikossa liikakasvun välttämiseksi. Solujen jakaminen aloitettiin huuhtelemalla solut fysiologiselle pH-alueelle puskuroidulla PBS:llä (phosphate buffered saline). Huuhtelun jälkeen maljalle lisättiin trypsinogeeniä maljaa kevyesti heilutellen solujen irrottamiseksi maljan pohjasta. Irrotuksen jälkeen muodostunut solususpensio siirrettiin uudelle kasvatusmaljalle laimentaen 1:10 tai 1:20 elatusliuokseen. Viljelmiä ylläpidettiin + 37C inkubaattorissa.

## 5.2 Transfektioon käytettävien plasmidien eristys

Transfektioon käytetyt plasmidit tuotettiin XL-1 Blue -kantaan kuuluvissa E. coli -bakteereissa. Bakteerit oli säilötty -80 C pakastimeen. Bakteerit kasvatettiin broth-kasvatusliuoksessa yön yli + 37 C tasoravistimessa. Seuraavana aamuna haluttu plasmidi eristettiin kaupallisella Qiagen Plasmid Midi Kit:llä seuraten valmistajan tarjoamaa Quick Start -protokollaa.

## 5.3 Transfektiot

Halutut plasmidit transfektoitiin HEK 293T -soluihin hyödyntäen kalsiumfosfaattitransfektiota (53). Transfektiot suoritettiin maljaamalla haluttu määrä soluja transfektioaljalle. Transfektio toteutettiin lisäämällä transfektoitavien solujen päälle haluttu määrä siirrettävää plasmidia, esim. kinaasi, paxilliini (tunnettu Src-perheen fosforylaatiokohde) sekä Nef transfektiokontrollina. Plasmidien lisäksi transfektioliuokseen lisättiin  $\text{CaCl}_2$  sekä vettä, jotta kokonaistilavuudeksi saavutettiin 50  $\mu\text{l}$  ja inkuboitiin 15 min. Tämän jälkeen liuosta sekoitettiin Vortex-sekoittimella lisäten 50  $\mu\text{l}$  HEPES-puskuria, jolloin lopullinen transfektiolioksen tilavuus oli 100  $\mu\text{l}$ . Valmis transfektioliuos pipetoitiin maljalle solujen päälle. Elatusliuos vaihdettiin vuorokauden kuluttua uuteen. Transfektiotehokkuus tarkastettiin transfektiota seuraavana päivänä hyväksikäyttäen paxilliiniin liitettyä GFP:tä fluoresenssimikroskopiassa. Transfektio katsottiin onnistuneeksi, kun mikroskooppilla elatusmaljasta silmämääräisesti arvioiden saatiin GFP-signaali yli 50 % soluista.

## 5.4 Plasmidit

Tutkittujen tyrosiinikinaasien ekspressioon tarvittava DNA transfektoitiin kohdesoluihin plasmideissa. Tyrosiinikinaasia oli muokattu seuraavasti: kinaasin C-terminaaliseen päähän oli liitetty biotinylaatiodomeeni kinaasin detektiota ja eristämistä varten. Kinaasin aktiivisuuden säätelyyn osallistuva tyrosiinitähdde  $Y_T$  oli korvattu fenyyylalaniinilla, minkä seurauksena kinaasi on pysyvästi aktiivisessa konformaatiossa. Tämän tarkoituksena on estää biotinylaatiodomeenin mahdollinen steerinen häirintä kinaasin toimintaan. Kinaasin ekspression tehostamiseksi plasmidissa oli ihmisen EF-1 $\alpha$  promoottori. Tyrosiinikinaasi Hck:sta oli myös käytössä villityyppi. Tyrosiinikinaasien fosforylaatiokohteeksi valittiin

paxilliini, johon oli liitetty GFP-sekvenssi transfektiotehokkuuden arvioimiseksi. Transfektiokontrollina käytettiin Nef:iä.

### 5.5 Solujen hajotus ja proteiinien eristys

Solut hajotettiin proteiinien fosforylaatiotasojen mittaamiseksi, kun selvitettiin tyrosiinikinaasien aktiivisuutta ja/tai inhibitiota. Solujen hajotus aloitettiin poistamalla elatusliuos ja suspensoimalla solut 1 ml PBS, joka on puskuroitu fysiologiseen pH:n. Suspensioon lisättiin 100 µl lyysipuskuria, jossa oli 50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl sekä 1% IGEPAL CA-630 -detergentti. Lisäksi proteiinien hajoamisen estämiseksi ja fosforylaatiosignaalin säilyttämiseksi lyysipuskuriin lisättiin jokaista valmistettua 10 ml kohti 1 tabletti Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail sekä Pierce Inhibitor Mini Tablets. Hajotuspuskurin lisäämisen jälkeen solususpensiota pidettiin 10 min jäähauteessa, jonka jälkeen suspensiossa nestefaasiin jääneet proteiinit erotettiin hajonneesta solumateriaalista sentrifuugissa sentrifugoimalla suspensiota 10 min +4 C 10 000 rpm. Hajotuksen jälkeen näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin absorptiospektrofotometrialla aallonpituudella 595 nm hyödyntäen Bradfordin menetelmää (54), jotta SDS-PAGE-ajoa varten näytteet olisivat yhdenmukaiset toisiinsa nähden.

### 5.6 Western blot

Tyrosiinikinaasien kinaasiaktiivisuutta mitattiin Western blot -menetelmällä (55). Näytteet valmisteltiin blottausta varten erottelemalla ne molekyylimassansa perusteella fraktioihin SDS-PAGE-menetelmällä (56). Geelijoa varten näytteet käsiteltiin + 100 C 4 min yhdessä 1:4 laimennetun PAGE-puskurin sekä merkaptoetanolin (50 µl/ml) kanssa. Elektroforeesi suoritettiin asetuksilla 200 V 300 mA, ajo kesti kokonaisuudessaan 45 min. Molekyylipainostandardina käytettiin Prestained Protein Marker Broad Range New England Biolabs -valmistetta. Geelijon jälkeen proteiinit siirrettiin nitroselluloosamembraanille, siirtoon käytettiin 20 V jännitettä ja 200 mA virtaa 40 min ajan. Siirron onnistuminen tarkistettiin Ponceau-värjäyksellä. Nitroselluloosamembraanille siirron ja värjäyksen jälkeen membraaneja inkuboitiin keinuttimessa 30 min 5 % maitoliuoksessa epäspesifisen vasta-ainesitoutumisen estämiseksi. Tämän jälkeen kalvot huuhdeltiin PBS:llä.

Fosforylaatiotasojen mittaamiseksi käytettiin Anti-Pax-Py-118 (hiiri) vasta-ainetta laimennettuna 1:1000. Sekundaarivasta-aineena käytettiin anti-hiiri-vasta-ainetta laimennettuna 1:10000. Muita käytössä olleita vasta-aineita olivat SA-800 kinaasin ekspressiotasojen mittaamista varten, anti-GFP paxilliinin ekspressiotasojen arviointiin sekä 2F2 Nef-vasta-aine ekspressiokontrollina käytetyn Nef:n detektiota varten. Vasta-aineinkubaatio toteutettiin pimeässä + 4 C lämpötilassa keinuttimessa 12 tunnin ajan. Sekundaarivasta-aineinkubaatiot samoissa olosuhteissa, inkubaation kesto 60 min.

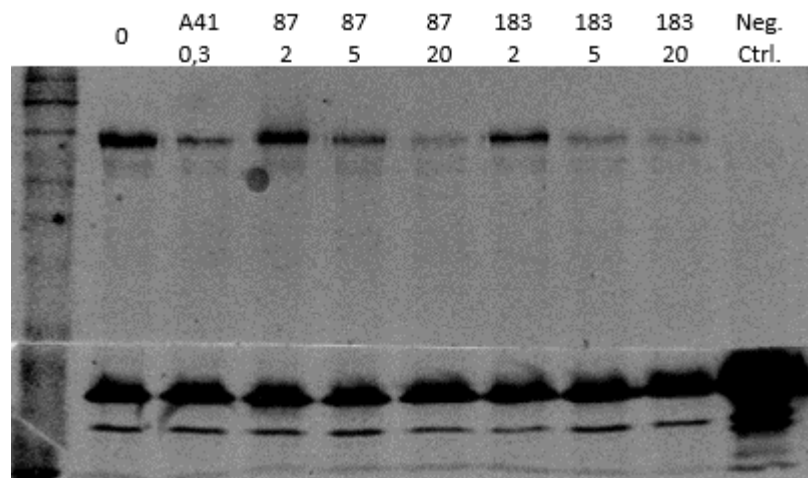
### 5.7 Fosforylaatiosignaalien detektio

Vasta-aineinkubaatioiden jälkeen näytteet analysoitiin käyttäen LI-COR Odyssey Scanner -laitetta, joka mittasi sekundaarivasta-aineista saatavan signaalin niille spesifisellä aaltopituudella. Saadut signaali-intensiteetit arvioitiin joko laadullisesti vertaamalla muihin näytteisiin tai kvantitatiivisesti mittaamalla tarkat intensiteetti-arvot ja suhteuttamalla ne kontrollinäytteen intensiteettiin.

## 6 Tulokset

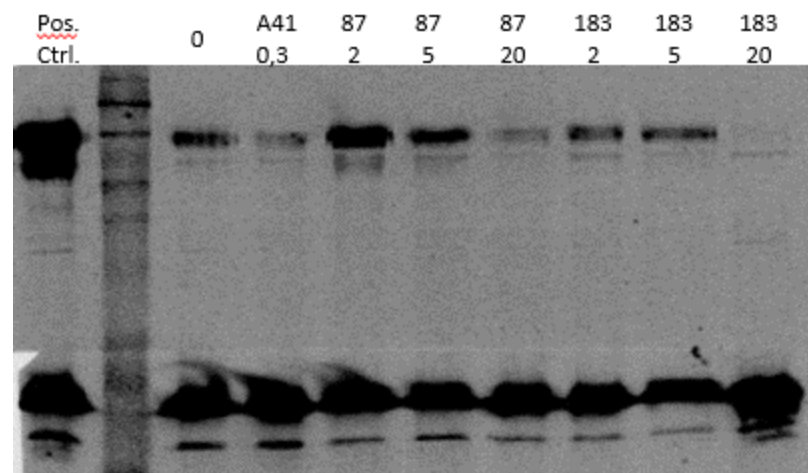
### 6.1 Tehokkaan inhibiittorikonsentraation määrittäminen

Ensimmäisessä inhibiittorien RM-1-87 (R87) ja RM-1-183 (R183) toimintaa elävässä solussa tutkivassa koeasetelmassa haluttiin selvittää yhdisteiden toksisuutta käytettäville soluille eri konsentraatioissa sekä tehokasta inhibiittorikonsentraatiota jatkokäyttöä varten. Koeasetelmassa 293T-soluja päätettiin inkuboida konsentraatioissa 2, 5 ja 20  $\mu\text{M}$  24 tunnin ajan. Tutkimuksessa käytettäviksi plasmideiksi valikoituivat Hck:n aktivoitu muoto, johon oli liitetty biotinylaatiodomeeni sekä villityyppiä edustava Hck-konstruktio, jota ei ole aktivoitu tyrosiinin substituutilla fenyylialaniiniin, kinaasiin on liitetty biotinylaatiodomeeni aktivoituneen muodon tavoin. Inhibiittorikontrollina käytettiin kaupallisesti saatavilla olevaa tunnettua Src-perheen inhibiittoria A419259 (A41), jonka tiedetään inhiboivan Hck:ta tehokkaasti 0,3  $\mu\text{M}$  konsentraatiolla (Kalle Saksela, suullinen tiedonanto) (57). Koeasetelma suoritettiin menetelmissä kuvatulla tavalla.



Kuva 2 Fenyylialaniinilla aktivoidun Hck:n inhibitiota mittaava Western blot

Kuvassa 2 ylempänä näkyvä signaali on peräisin paxilliinin Py-118-vasta-aineella havaitusta fosforylaatiosta. Alhaalla näkyvä voimakas signaali on peräisin transfektiokontrollista käytetystä Nef:stä, joka on visualisoitu 2F2-vasta-ainetta hyödyntäen. Fosforylaatiosignaalista voidaan selvästi nähdä Hck:n heikkenevä kyky fosforyloida paxilliinia inhibiittorin konsentraation kasvaessa.



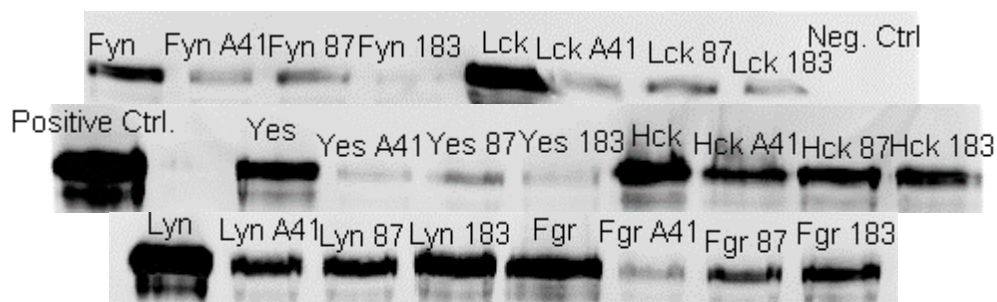
Kuva 3 Villityypin Hck inhibitiota mittaava Western blot

Ylläolevassa kuvassa 3 Western blot -signaalit ovat vastaavista lähteistä kuin kuvassa 2. Tässä analyysissä aktivoitu Hck oli korvattu villityypillä. Tuloksena aktivoitua muotoa vastaava inhiboituminen suuremmilla inhibiittorikonsentraatioilla. Huomionarvoista on

RM-1-183 tehokkaammalta vaikuttava inhibitio 20  $\mu$ M konsentraatiolla verrattuna Hck:n aktivoituun muotoon. Inhibiittorien toksisuutta soluille arvioitiin silmämääräisesti 24 tunnin inkubaation jälkeen. Solut olivat jakautuneet normaalisti, niiden morfologiassa ei havaittu eroja eikä kasvatusmaljojen pohjasta irronneita kuolleita soluja havaittu. Jatkomäärittelyä varten päätettiin käyttää 20  $\mu$ M inhibiittoripitoisuuksia sen voimakkaimman inhibitiovaikutuksen vuoksi. Inhibiittoreista RM-1-183 vaikuttaa tehokkaammalta Hck-inhibiittorilta kuin RM-1-87.

## 6.2 Inhibiittorin spesifisyyden määrittäminen tyrosiinikinaasi Hck:lle

Seuraavassa koeasetelmassa haluttiin selvittää inhibiittoreiden RM-1-87 ja RM-1-183 spesifisyys Hck:n kinaasiaktiivisuuden inhibitiolle verrattuna muihin Src-perheen tyrosiinikinaaseihin. Koeasetelmassa käytettäviksi kinaaseiksi valittiin Fyn, Lck, Yes, Lyn, Fgr ja Hck. Käytetyt tyrosiinikinaasikonstruktit vastasivat rakenteeltaan aiemmin kuvattua: plasmidissa transkriptiopromootori EF-1 $\alpha$ , tyrosiinin fosfoalaniinisubstituutio kinaasin aktivoimiseksi ja biotinylaatiodomeeni C-terminaalaisesti. Koeasetelmassa Transfektoiden jälkeen soluja inkuboitui vuorokauden ajan 0,3  $\mu$ M konsentraatiossa inhibiittorilla A419259



Kuva 4 Paxilliinin fosforylaatiosignaalin perusteella määritetty tyrosiinikinaasin aktiivisuus

(A41), 20  $\mu$ M konsentraatiossa inhibiittorilla RM-1-87 (87) tai RM-1-183 (183) ennen solujen hajottamista Western blotia varten. Vertailukelpoisten tulosten varmistamiseksi solujen hajotuksen jälkeen Western blot -näytteisiin mitattiin 30  $\mu$ g proteiinia.

Näytteistä mitattiin tarkat intensiteetti-arvot käyttäen LI-COR Odyssey Scanner -laitetta. Saadut intensiteetti-arvot suhteutettiin toisiinsa hyödyntäen transfektiokontrollina käytetyn Nef:n signaalia. Inhibiittorilla inkuboitujen näytteiden fosforylaatiosignaalia verrattiin saman tyrosiinikinaasin inhiboimattomaan fosforylaatiosignaaliin.



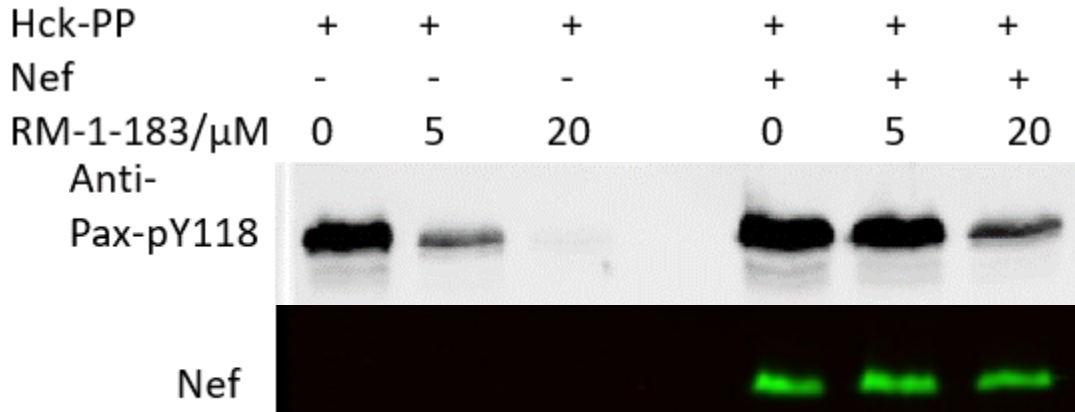
Taulukko 1

Fosforylaatioaktiivisuuden vertailusta käy ilmi, että kumpikaan tutkituista inhibiittoreista ei vaikuta olevan spesifinen Hck:lle. Tutkituista tyrosiinikinaaseista Lck, Yes, Lyn sekä Fgr inhiboituvat käytetyillä inhibiittoreilla jopa tehokkaammin kuin Hck.

### 6.3 Nef vaikutus inhibiittorin toimintaan

Inhibiittoreiden spesifisyyksimittausten jälkeen haluttiin selvittää voisiko transfektiokontrollina käytetyllä Nef:llä olla vaikutusta inhibiittorimolekyylin tehoon. Nef:n vaikutus inhibiittorin toimintaan tunnetaan difenyyllifuropyrimidiiniin perustuvien inhibiittorimolekyylien osalta, joiden toiminta tehostuu, kun Hck on Nef:n kanssa kompleksissa (52). Tutkimusasetelmassa käytettäväksi inhibiittoriksi valittiin RM-1-183 sillä aiemmissa koeasetelmissa se on vaikuttanut potentimmalta Hck-inhibiittorilta. Soluihin transfektoitiin jälleen paxillin-GFP ja edellä kuvattu Hck:n aktivoitu konstrukt. Nef:n vaikutuksen tutkimiseksi kolmeen soluviljelmään ei transfektoitu Nef:iä lainkaan ja kolmeen se transfektoitiin edelliseen tapaan. Molempien ryhmien soluja inkuboitiin valitussa inhibiittorissa 5 ja 20  $\mu$ M konsentraatioissa. Molemmista transfektioryhmistä valittiin myös kontrolliviljelmä, jota ei inkuboitu lainkaan inhibiittorissa.





Kuva 5 Nef:n vaikutus inhibiittorin tehoon (Tapio Kesti)

Nef näyttää selvästi heikentävän inhibiittorin RM-1-183 toimintaa 293T-soluissa.

## 7 Pohdinta

Tutkitut spesifisiksi Hck-kinaasi-inhibiittoreiksi aiotut molekyylit RM-1-87 ja RM-1-183 eivät tässä tutkimuksessa tehtyjen mittausten perusteella ole spesifisiä Hck-inhibiittoreita. RM-1-87 ja RM-1-183 sen sijaan osoittavat selvää epäselektiivistä tyrosiinikinaasi-inhibitioaktiivisuutta konsentraatiolla 20  $\mu$ M. Tutkituista molekyyleistä RM-1-183 vaikuttaa tehokkaamalta inhibiittorilta, kun kohdemolekyylinä on Hck. Spesifisyys selvittelyt paljastivat, että käytetyssä koeasetelmassa molemmat tutkitut inhibiittorimolekyylit inhiboivat tehokkaammin kaikkia muita tutkittua Src-perheen kinaaseja kuin Hck:ta. Inhibiotehokkuudeltaan ne vaikuttavat myös olevan vähemmän potentteja kuin tunnettuna kontrollina käytetty A419259.

Huomionarvoinen havainto on Nef:n vaikutus inhibiittorin RM-1-183 tehokkuuteen sen inhiboidessa Hck:n aktiivisuutta. Tämän kaltainen inhibitioaktiivisuuden muutos on päinvastainen verrattuna kirjallisuudessa aiemmin kuvattujen difenyylifuropyrimidiinipohjaisten inhibiittorimolekyylien kanssa, joiden toiminta tehostuu Nef:n vaikutuksesta. Hck-Nef-kompleksin rakennetta käsittelevissä tutkimuksissa on todettu, että Nef:n Hck:ta aktivoiva vaikutus ei perustu samankaltaiseen konformaatiomuutokseen kuin Hck:n aktivoituminen normaalitilanteessa, vaan on hienovaraisempi (58). Tämänkaltaisen normaalista poikkeava Nef:n aktivoima muoto

tarjoaa difenyylifuropyrimidiinipohjaisille inhibiittoreille toimintaympäristön. Tässä tutkimuksessa karakterisoitu RM-1-183 taas ei näytä hyötyvän Nef:n vaikutuksesta, vaan päinvastoin sen teho vaikuttaa olevan heikompi verrattuna soluihin, joissa Nef ei ilmennyt.

Nef:n inhibiittorin toimintaa estävä vaikutus on huomattava este molekyylien jatkokehitykselle mahdollisena lääkeaineena HIV-infektion hoitoon. Spesifisyyksmittausten perusteella kyseessä ei myöskään ole Hck:lle spesifinen inhibiittori kuten aiemmat in vitro -määritykset antoivat ymmärtää. Mielenkiintoisena jatkoselvittelykohteena tarjoutuu kuitenkin elävissä soluissa tehtävät jatkotutkimukset, joissa Nef on jätetty pois, erityisesti inhibiatioaktiivisuuden osalta sekä onko Nef:n läsnäololla vaikutusta molekyylien spesifisyyteen Src-perheen sisällä. Mikäli molekyylit osoittaisivat spesifisyyttä Hck:n inhibitiolle, voisi tutkimuksen painotusta siirtää HIV-infektion hallinnasta muihin sairauksiin, joissa Hck:n liiallinen aktiivisuus on osa patogeneesiä.

HI-virus muodostaa edelleen merkittävän globaalin terveysongelman tehokkaasta antiviraalisesta lääkityksestä huolimatta. Potilaiden ennusteen ja elämänlaadun parantamiseksi uusien sairausmekanismien ja mahdollisten lääkeaineiden tutkimus on tärkeää. Vaikka tässä tutkimuksessa ei tehokasta lääkemolekyyliä jatkokehitystä varten voitu tunnistaa, on myös umpikujaksi osoittautuvien tutkimuspolkujen läpikäyminen hyödyllistä, sillä ne saattavat paljastaa yllättäviä hyötyjä samankaltaisten sairausmekanismien osalta.

## Lähdeluettelo

- (1) World Health Organisation. HIV/AIDS. 2018; Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Accessed 05/27, 2018.
- (2) Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 2011;6:223-248.
- (3) Paiardini M, Muller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev* 2013 Jul;254(1):78-101.
- (4) Jukka Suni, Kalle Saksela, Matti Ristola. Mikrobiologia, Ihmisen immuunivirukset. Mikrobiologia. 3. painos ed.: Duodecim; 2012. p. 640-667.
- (5) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983 May 20;220(4599):868-871.
- (6) Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003 Nov;77(21):11708-11717.
- (7) Little SJ, McLean AR, Spina CA, Richman DD, Havlir DV. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* 1999 Sep 20;190(6):841-850.
- (8) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Nov 25;94(24):13193-13197.
- (9) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997 Nov 14;278(5341):1295-1300.
- (10) Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997 Nov 14;278(5341):1291-1295.
- (11) Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 2003 Jun;9(6):727-728.
- (12) Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2008 Mar 1;197(5):714-720.
- (13) Sheth PM, Chege D, Shin LY, Huibner S, Yue FY, Loutfy M, et al. Immune reconstitution in the sigmoid colon after long-term HIV therapy. *Mucosal Immunol* 2008 Sep;1(5):382-388.

- (14) Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986 Sep 5;233(4768):1089-1093.
- (15) Koppensteiner H, Brack-Werner R, Schindler M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology* 2012 Oct 4;9:82-4690-9-82.
- (16) Le Douce V, Herbein G, Rohr O, Schwartz C. Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* 2010 Apr 9;7:32-4690-7-32.
- (17) Herbein G, Gras G, Khan KA, Abbas W. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* 2010;7:34-4690-7-34.
- (18) Geleziunas R, Xu W, Takeda K, Ichijo H, Greene WC. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature* 2001 Apr 12;410(6830):834-838.
- (19) Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4(7):704-712.
- (20) Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004 Aug 15;104(4):942-947.
- (21) Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 2008 Jan 1;197(1):126-133.
- (22) Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, et al. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Aug 28;98(18):10362-10367.
- (23) Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR. Proinflammatory cytokines in HIV disease-a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev* 2005 Jul-Sep;7(3):168-180.
- (24) van Grevenynghe J, Cubas RA, Noto A, DaFonseca S, He Z, Peretz Y, et al. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 2011 Oct;121(10):3877-3888.
- (25) Kwa S, Kannanganat S, Nigam P, Siddiqui M, Shetty RD, Armstrong W, et al. Plasmacytoid dendritic cells are recruited to the colorectum and contribute to immune activation during pathogenic SIV infection in rhesus macaques. *Blood* 2011 Sep 8;118(10):2763-2773.
- (26) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004 Mar 5;303(5663):1526-1529.

- (27) Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, et al. CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J Immunol* 2004 Aug 15;173(4):2410-2418.
- (28) Burdo TH, Lentz MR, Autissier P, Krishnan A, Halpern E, Letendre S, et al. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J Infect Dis* 2011 Jul 1;204(1):154-163.
- (29) Schindler M, Munch J, Kutsch O, Li H, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 2006 Jun 16;125(6):1055-1067.
- (30) Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011 May 15;203(10):1474-1483.
- (31) Sacre K, Hunt PW, Hsue PY, Maidji E, Martin JN, Deeks SG, et al. A role for cytomegalovirus-specific CD4+CX3CR1+ T cells and cytomegalovirus-induced T-cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. *AIDS* 2012 Apr 24;26(7):805-814.
- (32) Ruemmele FM, Beaulieu JF, Dionne S, Levy E, Seidman EG, Cerf-Bensussan N, et al. Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut* 2002 Dec;51(6):842-848.
- (33) Kaser A, Tilg H. Inflammatory bowel diseases: highlights from the United European Gastroenterology Week 2008. *Expert Opin Ther Targets* 2009 Feb;13(2):259-263.
- (34) Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, et al. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog* 2010 Aug 19;6(8):e1001052.
- (35) Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 2008 Oct 1;112(7):2826-2835.
- (36) Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 2004 Feb;78(3):1160-1168.
- (37) Lee JH, Wittki S, Brau T, Dreyer FS, Kratzel K, Dindorf J, et al. HIV Nef, paxillin, and Pak1/2 regulate activation and secretion of TACE/ADAM10 proteases. *Mol Cell* 2013 Feb 21;49(4):668-679.
- (38) Lee JH, Schierer S, Blume K, Dindorf J, Wittki S, Xiang W, et al. HIV-Nef and ADAM17-Containing Plasma Extracellular Vesicles Induce and Correlate with Immune Pathogenesis in Chronic HIV Infection. *EBioMedicine* 2016 Apr;6:103-113.

- (39) Pereira EA, daSilva LL. HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic* 2016 Sep;17(9):976-996.
- (40) Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, Cullen BR. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* 1993 Jun 1;177(6):1561-1566.
- (41) Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991 Apr 11;350(6318):508-511.
- (42) Wonderlich ER, Leonard JA, Collins KL. HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein. *Adv Virus Res* 2011;80:103-127.
- (43) Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 2015 Oct 8;526(7572):218-223.
- (44) Campbell TD, Khan M, Huang MB, Bond VC, Powell MD. HIV-1 Nef protein is secreted into vesicles that can fuse with target cells and virions. *Ethn Dis* 2008 Spring;18(2 Suppl 2):S2-14-9.
- (45) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Molecular Biology of the Cell. 5th edition ed.: Garland Science; 2008. p. 175-178.
- (46) Kumar A, Jaggi AS, Singh N. Pharmacology of Src family kinases and therapeutic implications of their modulators. *Fundam Clin Pharmacol* 2015 Apr;29(2):115-130.
- (47) Poh AR, O'Donoghue RJ, Ernst M. Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. *Oncotarget* 2015 Jun 30;6(18):15752-15771.
- (48) Hanna Z, Weng X, Kay DG, Poudrier J, Lowell C, Jolicoeur P. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J Virol* 2001 Oct;75(19):9378-9392.
- (49) Pene-Dumitrescu T, Shu ST, Wales TE, Alvarado JJ, Shi H, Narute P, et al. HIV-1 Nef interaction influences the ATP-binding site of the Src-family kinase, Hck. *BMC Chem Biol* 2012 Mar 15;12:1-6769-12-1.
- (50) Saksela K, Cheng G, Baltimore D. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J* 1995 Feb 1;14(3):484-491.
- (51) Lee JH, Ostalecki C, Zhao Z, Kesti T, Bruns H, Simon B, et al. HIV Activates the Tyrosine Kinase Hck to Secrete ADAM Protease-Containing Extracellular Vesicles. *EBioMedicine* 2018 Feb;28:151-161.
- (52) Emert-Sedlak L, Kodama T, Lerner EC, Dai W, Foster C, Day BW, et al. Chemical library screens targeting an HIV-1 accessory factor/host cell kinase complex identify novel antiretroviral compounds. *ACS Chem Biol* 2009 Nov 20;4(11):939-947.

(53) Kingston RE, Chen CA, Rose JK. Calcium phosphate transfection. Curr Protoc Mol Biol 2003 Aug;Chapter 9:Unit 9.1.

(54) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976 May 7;72:248-254.

(55) Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 1981 Apr;112(2):195-203.

(56) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970 Aug 15;227(5259):680-685.

(57) Wilson MB, Schreiner SJ, Choi HJ, Kamens J, Smithgall TE. Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. Oncogene 2002 Nov 21;21(53):8075-8088.

(58) Wales TE, Hochrein JM, Morgan CR, Emert-Sedlak LA, Smithgall TE, Engen JR. Subtle Dynamic Changes Accompany Hck Activation by HIV-1 Nef and are Reversed by an Antiretroviral Kinase Inhibitor. Biochemistry 2015 Oct 20;54(41):6382-6391.

Kuva 1: Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. Ashleigh R. Poh, Robert J.J. O'Donoghue, Matthias Ernst - Oncotarget, Vol. 6, No. 18 (2015), Figure 1A